

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-234074

(43)Date of publication of application : 09.09.1997

(51)Int.Cl.

C12N 15/09

C07H 21/04

C12Q 1/68

(21)Application number : 08-045927

(71)Applicant : SUMITOMO ELECTRIC IND LTD

(22)Date of filing : 04.03.1996

(72)Inventor : KISHIMOTO TOSHIHIKO

(54) ADAPTER DOUBLE-STRANDED DNA AND AMPLIFICATION OF DNA BY USING THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for amplifying DNAs by which various DNAs having a long to a short lengths are simultaneously and uniformly amplified at a time and to obtain an adapter double-stranded DNA utilizable for the amplification.

SOLUTION: This adapter double-stranded DNA is the one capable of bonding to a DNA to be amplified only at one terminal and various DNAs are simultaneously and uniformly amplified by performing a PCR(polymerase chain reaction) under the following conditions by using the adapter double-stranded DNA: That is, (1) the adapter double-stranded DNA is bonded to the DNA to be amplified; (2) a primer single-stranded DNA having a base sequence of a single-stranded DNA having the terminal, located on the side unbonded to the DNA to be amplified and corresponding to the 5'-terminal among the single-stranded DNAs composing the adapter double-bonded DNA is used; (3) a long-chain DNA amplifying enzyme is used and (4) the PCR cycle has two steps.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-234074

(43) 公開日 平成9年(1997)9月9日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9282-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 Q 1/68		7823-4B	C 1 2 Q 1/68	A

審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願平8-45927

(22) 出願日 平成8年(1996)3月4日

(71) 出願人 000002130

住友電気工業株式会社

大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号

(72) 発明者 岸本 利彦

神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 住友電気工業株式会社横浜製作所内

(74) 代理人 弁理士 上代 哲司 (外2名)

(54) 【発明の名称】 アダプター二本鎖DNA及びそれを用いたDNA増幅方法

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、一度に多種多様なDNAを同時に短い物から長いものまでを均一に増幅するDNA増幅方法及びそのために利用可能なアダプター二本鎖DNAの開発を課題とする。

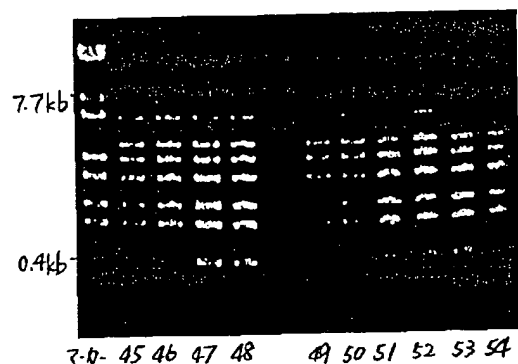
【解決手段】 一方の末端でのみ増幅されるDNAと結合できるアダプター二本鎖DNAを提供し、該アダプター二本鎖DNAを用いて下記に挙げる条件下でPCRを行うことにより、多種類のDNAを同時に均一に増幅する遺伝子増幅方法。

①アダプター二本鎖DNAを増幅されるDNAと結合させる。

②アダプター二本鎖DNAを成す一本鎖DNAのうち、増幅されるDNAに結合しない側の末端が5'末端に当たる一本鎖DNAの塩基配列を有するプライマー一本鎖DNAを用いる。

③長鎖DNA増幅酵素を用いる。

④PCRのサイクルが二段階のステップである。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の特徴を持つアダプター二本鎖DNA。

①一方の末端で、該アダプター二本鎖DNAを成す一本鎖DNAのうちいずれか一方が、増幅されるDNA又は他のアダプター二本鎖DNAに結合できないように突出していること。

②増幅されるDNAに結合する側の末端では、該アダプター二本鎖DNAを成す一本鎖DNAのうち当該末端が5'末端に当たる一本鎖DNAがリン酸化されていること。

【請求項2】 粘着末端を生成する制限酵素サイト又は平滑末端を生成する制限酵素サイトを、増幅されるDNAに結合しない側の末端以外に含む請求項1に記載のアダプター二本鎖DNA。

【請求項3】 粘着末端を生成する制限酵素サイトと平滑末端を生成する制限酵素サイトを合わせて3カ所以上有する請求項2に記載のアダプター二本鎖DNA。

【請求項4】 粘着末端を生成する制限酵素サイトがEcoRI又はNotIであり、平滑末端を生成する制限酵素サイトがEcoRVである請求項3に記載のアダプター二本鎖DNA。

【請求項5】 配列表の配列番号1に記載の配列である一本鎖DNAと、配列表の配列番号2に記載の配列でありその5'末端をリン酸化した一本鎖DNAとをハイブリダイズさせたものであるアダプター二本鎖DNA。

low mix (最初に加える反応液)

プライマー (5 pmol/μl)	0.1~1.0 μl
Mg (OAc) ₂ (25mM)	0.88~1.2 μl
dNTP (2.5mM)	1.2~1.6 μl
3.3×反応緩衝液	2.4 μl

滅菌蒸留水で8 μlに調製する。

滅菌ワックス (上記に加える。)

up mix 1 (滅菌ワックスが固まってから加える反応液)

3.3×反応緩衝液	3.6 μl
酵素 (Tth XL (登録商標、パーキンエルマー社製))	0.4 μl

up mix 2 (滅菌ワックスが固まってから加える反応液)

鋳型DNA	2.0 μl
滅菌蒸留水	6.0 μl

【請求項12】 反応液の組成が以下のものであること

low mix (最初に加える反応液)

プライマー (5 pmol/μl)	1 μl
Mg (OAc) ₂ (25mM)	1.2 μl
dNTP (2.5mM)	1.6 μl
3.3×反応緩衝液	2.4 μl
滅菌蒸留水	1.8 μl
滅菌ワックス	

up mix 1 (滅菌ワックスが固まってから加える反応液)

3.3×反応緩衝液	3.6 μl
酵素 (Tth XL (登録商標、パーキンエルマー社製))	0.4 μl

【請求項6】 化学的修飾又は酵素的修飾したものである請求項1ないし5のいずれか一項に記載のアダプター二本鎖DNA。

【請求項7】 請求項1ないし6に記載のアダプター二本鎖DNAを成す一本鎖DNAのうち、増幅されるDNAに結合しない側の末端が5'末端に当たる一本鎖DNAの塩基配列を有するプライマー一本鎖DNA。

【請求項8】 配列表の配列番号1の塩基配列を有するプライマー一本鎖DNA。

【請求項9】 下記の①ないし④の条件でDNA増幅反応を行うことを特徴とするDNA増幅方法。

①請求項1ないし6のいずれかに記載の二本鎖DNAをアダプターDNAとして用いて増幅されるDNAと連結すること。

②請求項7又は8に記載の一本鎖DNAをプライマーとして用いて鋳型DNAとハイブリダイズさせること。

③長鎖DNA増幅酵素を用いて伸長反応させること。

④PCRのサイクルが二段階のステップであること。

【請求項10】 長鎖DNA増幅酵素が、変異修飾能力が高いことを特徴とする請求項9に記載のDNA増幅方法。

【請求項11】 以下の組成の反応液を、最初にlow mix加え、滅菌ワックスが固まった後up mix 1及びup mix 2を加えて用いることを特徴とする請求項9に記載のDNA増幅方法。

を特徴とする請求項11に記載のDNA増幅方法。

up mix 2 (滅菌ワックスが固まってから加える反応液)

鋳型DNA

2. 0 μ l

滅菌蒸留水

6. 0 μ l

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、一度に多種多様なDNAを同時に短い物から長いものまでを均一に増幅する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】従来のDNA増幅方法は、Taqポリメラーゼ (Taq polymerase) を用いたポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction (以下PCR)) が主に用いられてきた。この方法は、耐熱性のDNA複製酵素であるTaq polymeraseを用いることにより、試験管内 (チューブ内) で連続してDNAの変性、プライマーのアニーリング (結合)、DNAの合成 (伸長反応) を繰り返し行うものである。まずDNAの変性は90℃以上の温度で行い、プライマーのアニーリングは50～70℃程度の温度で、DNAの合成は68～75℃程度で行われる。耐熱性のDNA複製酵素であるTaq polymeraseはこれらのサイクルにおいても失活しない酵素であり、クレノーフラグメント (klenow fragment) 等では不可能であった試験管内 (チューブ内) で連続してDNAの変性、プライマーのアニーリング (結合)、DNAの合成を繰り返し行うことを可能とするものである。

【0003】また、最近、PCR用の耐熱性酵素として20kb以上のDNAの増幅が可能となる酵素が開発され利用されてきている。しかし、この酵素を用いたPCR方法は、主として目的とする特定のDNAを増幅することを目的としており、多種多様なDNAを一括して増幅することは困難であった。他方、一度にいくつかのDNAを同時に増幅する試みもなされているが、増幅するDNAの種類は5種類程度までと少なく、また、増幅しているDNAの長さも1kb程度までである。また、DNAの増幅を重ねると、短いDNAが増幅されやすいが、この点を克服することはほとんどなされていない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】上記のように、一度に多種多様なDNAを同時に短い物から長いものまでを均一に増幅するDNA増幅方法は開発がなされていない状況であり、本発明は、DNA増幅方法を開発することを課題とする。及びそのために好適に用いられるアダプター二本鎖DNAの開発を課題とする。より詳細には、PCRでは増幅すべきDNA (増幅されるDNA) をまずプライマーとハイブリダイズさせるが、一度に多種多様なDNAを同時に短い物から長いものまでを均一に増幅する場合において、全てのDNAにハイブリダイズするプライマーというのはないので、増幅されるDNAにプラ

イマーを直接ハイブリダイズさせる方法にとらわれないDNA増幅方法を開発することを課題とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】そこで、本発明者は、増幅されるDNAにアダプターDNA (アダプター二本鎖DNAと同意) を結合させ、該アダプターDNAにハイブリダイズするプライマーを用いる方法並びにアダプターDNA及びプライマーを開発した。さらに、本発明者は、長鎖DNAを増幅するのに用いる酵素 (長鎖DNA増幅酵素)、反応温度、反応サイクル、Mg²⁺濃度等のPCRにおける操作条件や操作方法を検討した結果、前記アダプターDNA及びプライマーを用いた多種多様なDNAを同時に均一に増幅するDNA増幅方法を開発した。

【0006】まず、本発明のアダプター二本鎖DNAの態様を下記に挙げる。なお、本明細書で言う増幅されるDNAとはPCRの最初に存在するDNAであり、該DNAにアダプターが結合する。また、増幅されるDNAとアダプターDNAとが結合したものを本明細書では鋳型DNAと言う。本発明のアダプター二本鎖DNAの第1態様は、下記①及び②の要件をみたすものである。

①一方の末端で、アダプター二本鎖DNAを成す一本鎖DNAのうちいずれか一方が、増幅されるDNA又は他のアダプター二本鎖DNAに結合できないように突出していること。

②増幅されるDNAに結合する側の末端では、該アダプター二本鎖DNAを成す一本鎖DNAのうち、当該末端が5'末端に当たる一本鎖DNAがリン酸化されていること。この第1態様のアダプター二本鎖DNAの増幅されるDNAに結合する側の末端は、平滑又はアダプター同士が結合せず且つ増幅されるDNAに結合するような突出のいずれでもよい。

【0007】本発明のアダプター二本鎖DNAの第2態様は、上記①及び②並びに下記③の要件をみたすものである。

③粘着末端を生成する制限酵素サイトを、増幅されるDNAに結合しない側の末端以外に含む。本発明のアダプター二本鎖DNAの第3態様は、上記①及び②並びに下記④の要件をみたすものである。

④平滑末端を生成する制限酵素サイトを、増幅されるDNAに結合しない側の末端以外に含む。本発明のアダプター二本鎖DNAの第4態様は、上記①及び②並びに上記③及び④の要件をみたすものである。本発明のアダプター二本鎖DNAの第5態様は、上記①及び②並びに下記⑤の要件をみたすものである。

⑤EcoRI又はNotIのいずれか一方又は両方の制限酵素サイトを、増幅されるDNAに結合しない側の末

端以外に含む。本発明のアダプター二本鎖DNAの第6態様は、上記①及び②並びに下記⑥の要件をみたすものである。

⑥EcoRV制限酵素サイトを、増幅されるDNAに結合しない側の両末端以外に含む。本発明のアダプター二本鎖DNAの第7態様は、上記①及び②並びに下記⑦の要件をみたすものである。

⑦EcoRI、NotI及びEcoRV制限酵素サイトを、増幅されるDNAに結合しない側の末端以外に含む。

【0008】本発明のアダプター二本鎖DNAの第8態様は、下記⑧の要件をみたすものである。

⑧配列表の配列番号1に記載の配列である一本鎖DNAと、配列表の配列番号2に記載の配列でありその5'末端をリン酸化した一本鎖DNAとをハイブリダイズさせたものである。

【0009】本発明のアダプター二本鎖DNAの第9態様は、上記の各態様のアダプター二本鎖DNAを化学的修飾又は酵素的修飾したものである。

【0010】次に、本発明のプライマー一本鎖DNAの態様は、上記の本発明のアダプター二本鎖DNAを成す一本鎖DNAのうち、増幅されるDNAに結合しない側の末端が5'末端に当たる一本鎖DNAの塩基配列を有することである。例えば、上記第9態様のアダプター二本鎖DNAに対しては、配列表の配列番号1の塩基配列を有するものが、プライマー（プライマー一本鎖DNAと同意）となる。

【0011】次に、本発明のDNA増幅方法の態様を下記に挙げる。

①上記本発明のアダプター二本鎖DNAを増幅されるDNAと連結させる。

②上記本発明のプライマー一本鎖DNAを用いる。

③長鎖DNA増幅酵素を用いる。

④PCRのサイクルが二段階のステップである。本発明のDNA増幅方法の第2の態様は、上記の①、②、④及び下記の⑤の条件でDNA増幅反応を行うものである。

⑤変異修飾能力が高い長鎖DNA増幅酵素を用いる。

【0012】

【発明の実施の形態】本発明のアダプターDNAは、増幅されるDNAと、一方の末端でのみ結合できる。具体的には、該アダプターDNAを成す二本の一本鎖DNAのうち、増幅されるDNAと結合する側の末端（結合側末端）が5'端に当たる一本鎖DNAを該末端でリン酸化しておくことにより、増幅されるDNAの端に該アダプターが直接結合出来る。このアダプターDNAの結合側末端は、平滑であってもよく、アダプター同士が結合せず且つ増幅されるDNAと結合できるような突出であってもよい。増幅されるDNAの末端は、必要に応じて修飾酵素により平滑化したり、制限酵素処理により該末端を制限酵素サイトとして突出させることができるの

で、その操作に合わせて使用するアダプターDNAの結合側末端を選択すればよい。増幅されるDNAを合成する場合には、該DNAの末端を、平滑、突出いずれにも合成可能である。いずれか合成した方に合わせてアダプターDNAの結合側末端を選択すればよい。

【0013】また、該アダプターの他端（非結合側末端）は、該アダプターDNAを成す二本の一本鎖DNAのうちのいずれか一方が突出しており、増幅されるDNA又は他のアダプター二本鎖末端と結合できない。この突出については、増幅されるDNAの末端が平滑である場合は、アダプターDNAの非結合側末端が単に突出していればよい。増幅されるDNAの末端が平滑でない場合、すなわち酵素処理されている場合は、このDNAの末端は制限酵素サイトとなっているので、アダプターDNAの非結合側の末端が制限酵素サイトでないように突出していればよい。アダプターDNA同士が結合しないようにするには、突出した一本鎖部分において、該一本鎖同士がハイブリダイズしないような配列であればよい。本発明のアダプターにより、増幅されるDNAの両端それぞれに、正確に一方で一だけアダプターを結合させることが可能となる。またアダプター同士が幾つもつながるようなことも起こらないため、正確にPCRが出来るようになる。アダプター二本鎖DNAの長さは、それを成す一本鎖DNAのうち、増幅されるDNAと結合しない末端で突出する方の長さが16塩基以上のものが好ましい。実用上、該一本鎖DNAが24塩基以上のものが特に好ましい。また、該一本鎖DNAの長さの上限は特にないが、実用上40塩基程度までのものが好ましい。

【0014】また、本発明のアダプターDNAは、その塩基配列に、粘着末端を生成する制限酵素サイト又は平滑末端を生成する制限酵素サイトのいずれか一方又は両方を該アダプターDNAの、増幅されるDNAに結合しない側の末端以外に含んでいることが好ましい。PCR後、該制限酵素サイトで処理して、ベクターへのDNA導入を行うことが容易になるからである。平滑末端は、ベクターへのDNA導入時に導入部分の配列依存性がないため、どのようなベクターへもDNAを容易に導入できる。したがって、平滑末端を生成する制限酵素サイトにより、どのようなベクターへもDNAを容易に導入することが可能である。平滑末端を生成する制限酵素サイトとして、EcoRVサイトが好適に使用可能である。

【0015】粘着末端は、平滑末端に比べ、ベクターへのDNAの導入効率が数倍以上向上する。したがって、粘着末端を生成する制限酵素サイトにより、どのようなベクターについても、該ベクターへDNAを導入を効率よく行うことが可能である。実際にベクターに粘着末端を有するDNAを導入するに当たっては、必要に応じて、ベクターの末端と導入しようとするDNAの末端の制限酵素サイトとを揃える処理を行えばよい。EcoR

I サイトは、最も汎用な粘着末端を生成する制限酵素サイトで、しかも市販のcDNAライブラリー用ベクターの殆どがこのサイトで処理されているため、アダプター二本鎖DNAがEcoRIサイトを含んでいることにより、市販のcDNAライブラリー用ベクターの使用が可能となり、増幅したDNAのcDNAライブラリー化等のDNA操作が容易となる。したがって、EcoRIサイトは好適に使用可能である。NotIサイトは、8塩基認識の粘着末端を生成する制限酵素であるため、非常に切断部位が少ない酵素である。このため、増幅したDNAをNotIサイトで処理した場合、該DNAの内部の配列の切断を最小限度にして該DNAに粘着末端を作製できる。したがって、粘着末端を生成する制限酵素サイトとして、NotIサイトが好適に使用可能である。

【0016】制限酵素サイトは、上記以外にも使用するcDNAライブラリー用ベクターにより、適宜選択して使用可能である。また、アダプターDNAが有する制限酵素サイトの数については、その長さに応じた範囲内で特に限定がない。粘着末端を生成する制限酵素サイトと平滑末端を生成する制限酵素サイトの両方を有するものが、好適に使用可能である。

【0017】本発明のプライマー一本鎖DNAは、上記の本発明のアダプター二本鎖DNAを成す一本鎖DNAのうち、増幅されるDNAに結合しない側の末端が5'末端に当たる一本鎖DNAの塩基配列を有する一本鎖DNAである。

【0018】本発明のアダプターDNA及びプライマーDNAは、その由来を問わず、例えばDNA合成機で合成されたものでもよく、また、細胞等より抽出したものの、該抽出物を加工したものいづれでもよい。また、プライマーの長さは、16塩基以上のものが好ましい。実用上、該一本鎖DNAが24塩基以上のものが特に好ましい。

【0019】ところで、DNAを化学合成・酵素合成（天然物の加工を含む）するときに、側鎖をメチル化すること、あるいはビオチン化すること、もしくはリン酸基部分のOをS置換すること等の化学的に修飾することはよく知られている。化学合成時に導入できる化学的修飾として、例えば、1) ビオチン化、2) メチル化、3) ジコクシゲニン化、4) 脱リン酸化、5) 蛍光標識化（フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッドおよびその誘導体）、6) アミノ化、7) リン酸基のSをOに置換したDNA、RNAの合成が主として挙げられる。また、酵素的修飾としては、例えば、1) ビオチン化、2) メチル化、3) ジコクシゲニン化、4) 脱リン酸化、5) 蛍光標識化（フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッドおよびその誘導体）、6) 酵素標識化（アルカリフォスファターゼ）が主に挙げられる。したがって、本発明のアダプターDNA及びプライマーDNAは、該化学的修飾又は酵素的修飾をされたDNAをそ

の範囲に含むものである。

【0020】本発明のDNA増幅方法は、下記の条件のPCR方法を提供し、多種多様なDNAを均一に増幅することを可能とするものである。特に、従来困難であった1kb以上の長いDNAを含む多種多様なDNAを同時に均一に増幅することを可能とする。

①本発明のアダプターDNAを増幅されるDNAと連結する。

②本発明のプライマーDNAとして用いる。

③長鎖DNA増幅酵素を用いる。

④PCRのサイクルが二段階のステップである。

【0021】本発明で用いる長鎖DNA増幅酵素は、特に制限なく使用可能である。実施例で挙げた市販の長鎖DNA増幅酵素はいずれも好適に使用可能である。メーカーにより若干の差違があり、実施例で示すように特にパーキンエルマー社製のTth XL（登録商標）が特に好適に使用可能である。これは、該酵素が、変異修飾能力が高いことを特長としていることに起因すると考えられ、したがって変異修飾能力の高い酵素は特に好適に使用可能であると言える。

【0022】PCRのサイクルについては、90℃以上のDNAの変性→68ないし75℃でのアニーリング及び伸長反応の2ステップのサイクルの繰返しであればよい。伸長反応の反応時間は10分以上でだんだん長くしていくのが好ましい。また、上記のサイクルの繰返しは、28回以上であることが好ましい。

【0023】また、伸長反応時の温度については、使用する酵素によりDNA合成反応が進む温度であればよい。反応至適温度で伸長反応することが好ましい。多くの酵素では、反応至適温度は約70℃である。

【0024】また、本発明のDNA増幅方法の特に望ましい態様は、下記の①ないし⑤の条件でDNA増幅反応を行うことである。

①アダプター二本鎖DNAとして、配列表の配列番号1に記載の配列である一本鎖DNAと、配列表の配列番号2に記載の配列でありその5'末端をリン酸化した一本鎖DNAとをハイブリダイズさせたものを用いて増幅されるDNAと連結する。

②プライマー一本鎖DNAとして、配列表の配列番号2に記載の配列である一本鎖DNAを用いる。

③Tth XLをDNA増幅酵素として用いる。

④PCRの反応を、hot startとし、94℃で1分間反応させた後、（94℃で15秒間→68℃で10分間）のサイクルを16回繰返し反応させ、続いて（94℃で15秒間→68℃で11分間）のサイクルを4回繰返し反応させ、続いて（94℃で15秒間→68℃で12分間）のサイクルを4回繰返し反応させ、続いて（94℃で15秒間→68℃で13分間）のサイクルを4回繰返し反応させることにより行う。

⑤以下の組成の反応液を、最初にlow mix加え、

滅菌ワックスが固まった後up mix 1及びup mix 2を加えて用いる。

low mix (最初に加える反応液)

プライマー (5 pmol/μl)	1. 0 μl
Mg (OAc) ₂ (25mM)	1. 2 μl
dNTP (2. 5mM)	1. 6 μl
3. 3×反応緩衝液	2. 4 μl
滅菌蒸留水	1. 8 μl

滅菌ワックス

up mix 1 (滅菌ワックスが固まってから加える反応液)

3. 3×反応緩衝液	3. 6 μl
酵素 (Tth XL (登録商標、パーキンエルマー社製))	0. 4 μl

up mix 2 (滅菌ワックスが固まってから加える反応液)

鋳型DNA (1. 6 ng/μl)	2. 0 μl
滅菌蒸留水	6. 0 μl

【0025】

<実施例1>アダプターDNAの合成

【実施例】以下に実施例を示し、本発明をさらに詳述するが、本発明はこの例に限定されるものではない。

1. 以下の配列を有するDNAを合成した。(BEX社での合成)

配列1	5' AGG AAT TCA GCG GCC GCA GAT ATC 3'
配列2	5' GAT ATC TGC GGC CGC TGA ATT C 3'

また、これらのDNAはBEX社にて簡易カートリッジにて精製を行った。なお、配列1は、配列表の配列番号1に示す配列であり、配列2は配列表の配列番号2に示

す配列である。これらの配列はアニーリングさせると以下の式(1)の形で二本鎖になる。

式(1)	5' AGG AAT TCA GCG GCC GCA GAT ATC 3'
	3' C TTA AGT CGC CGG CGT CTA TAG 5'

すなわち、配列1の5'末端が突出し、式(1)のアダプター二本鎖DNAは配列1の3'末端側でしか増幅されるDNAと結合できない。実際には、配列2の5'末端をリン酸化しているので、このアダプターは、該リン

酸化部位で、増幅されるDNAと結合する。また、このアダプターDNAの制限酵素サイトを図7に示す。

【0026】2. 配列2に関しては以下の条件で5'末端のリン酸化を行った。

10×kinase Buffer A (日本ジーン製)	5 μl
配列2のDNA (20 pmol/μl)	25 μl
10mM ATP	5 μl
T4ポリヌクレオチドキナーゼ (10 U/μl) (日本ジーン製)	3 μl
滅菌水	12 μl
合計	50 μl

37℃で60分間反応させ、その後75℃で10分間変性を行った。

で切断した。

3. 2. でリン酸化した配列2のDNAの溶液に、滅菌水で20 pmol/μlに調製した配列1のDNAを25 μl加え、95℃で10分間ボイルした後、60分間室温で放置し、二本鎖にハイブリダイズさせた。これをアダプターDNAとして以下に用いた。

λ DNA	15 μg
10×H buffer	24 μl (宝酒造製)
Sty I (10 U/μl)	3 μl (宝酒造製)
滅菌水	198 μl
合計	240 μl

37℃で8時間切断した。

【0027】<実施例2>PCRによる微量DNAの増幅反応

(2) 65℃で10分間失活操作を行った。その後滅菌水で50 ng/μlに調製した。

1. 増幅されるDNAの作製

【0028】2. 平滑末端化

1) DNAの切断及び失活操作

1) で調製したDNAを以下の条件で平滑末端化した。

(1) λ DNA (日本ジーン製) 15 μgを以下の条件

増幅されるDNA (50 ng/μl)	20 μl
0. 5mM dNTP	10 μl
10×klenow Buffer	10 μl
klenow enzyme (宝酒造製)	2 μl

滅菌水

58 μ l

合計

100 μ l

30℃で30分間反応させた後、65℃で15分間変性操作を行った。

【0029】2. 増幅されるDNAとアダプターDNAの結合

平滑化した増幅されるDNA (10 ng/ μ l)20 μ lアダプターDNA (6.7 pmol/ μ l)4.5 μ l

BSA (2 mg/ml) (日本ジーン製)

2 μ l

ヘキサミン塩化コバルト (20 mM) (日本ジーン製)

2 μ l

Spermidine (20 mM) (日本ジーン製)

2 μ l10 \times ligation Buffer (日本ジーン製)4 μ l

滅菌水

3.5 μ l

合計

38 μ l

16℃でオーバーナイト反応させた後、フェノール/クロロフォルム抽出を行い、回収した水相をTE溶液で平衡化されたS300 spun column (ファルマシア製) に取扱説明書に従った条件でかけて未反応のアダプターDNAの除去を行った。その後、回収した溶出液をTE溶液にて125 μ lに調製した (1.6 ng/ μ l)。

【0030】3. PCR

2. でアダプターを結合させた鋳型DNAを用いて、PCRによる微量DNAの増幅反応を行った。なお、伸長反応時の温度は、プライマーのアニーリングと同時に反応が進行する68℃が好ましい。

1) 酵素選択のための実験

PCRのための酵素は、Stoffel (登録商標、パ

1. で作製した平滑化した増幅されるDNAに実施例1で作製したアダプターDNAを日本ジーン製 ligation packを用いて連結した。連結条件は該 ligation packの説明書に従った。

ーキンエルマー製)、Ex Taq (登録商標、宝酒造製) 及びTakara Taq (登録商標、宝酒造製) の3種類を用いた。StoffelはDNA増幅に適した酵素であり、Ex Taqは長鎖DNA増幅酵素である。Takara Taqは通常のPCRに用いられる酵素である。PCRに用いた反応液の組成を表1 (A) 及び (B) に示す。表中、チューブナンバーを除いて各数値の単位は μ lである。プライマーは配列1のDNAであり、SPは滅菌蒸留水、Bは反応緩衝液である。各反応溶液を分注後、ミネラルオイルを重層し、PCRを行った。チューブナンバー1ないし16の反応液は下記のサイクル1で反応させ、チューブナンバー17ないし28の反応液は下記のサイクル2で反応させた。

【表1】

酵素種	Stoffel					Ex Taq							
鋳型DNA (1.6 ng/ μ l)	2	2	2	2	2	2	2	2	4	4	4	4	2
dNTP (2.5 mM)	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
10 \times B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
7 \times プライマー (5 pmol/ μ l)	2	4	2	4	0	2	4	8	2	4	8	0	0
酵素	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
SP	10.2	8.2	8.2	6.2	12.2	12.3	10.3	6.3	10.3	8.3	4.3	14.3	
MgCl ₂ (25 mM)	2	2	4	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0
チューブNa (サイクル1)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
チューブNa (サイクル2)	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	

(B)

酵素種	Takara Taq			
鋳型DNA (1.6 ng/ μ l)	2	2	2	2
dNTP (2.5 mM)	1.6	1.6	1.6	1.6
10 \times B	2	2	2	2
7 \times プライマー (5 pmol/ μ l)	2	4	8	0
酵素	0.1	0.1	0.1	0.1
SP	12.3	10.3	6.3	14.3
MgCl ₂ (25 mM)	0	0	0	0
チューブNa (サイクル1)	13	14	15	16
チューブNa (サイクル2)	—	—	—	—

【0031】サイクル1：94℃で5分間反応させた後、（94℃で1分間→55℃で1分間→72℃で10分間）のサイクルを30回繰り返して反応させた。
 サイクル2：94℃で1分間反応させた後、（98℃で20秒間→68℃で15分間）のサイクルを30回繰り返して反応させた。

【0032】反応後、各反応液から5μlの反応液をとり、0.7%アガロースゲル電気泳動で分析した。これを、蛍光色素エチジウムブロマイドで染色した。結果を図2（A）及び図2（B）に示す。図中に示した各レーンの数字は、各反応液のチューブナンバーに対応している。また、各レーンにおいて、各レーン中の各バンドの現れ方が、マーカーのバンドの現れ方と似ているほど、DNA増幅がうまく行われていることを表す。この図から、短いDNAから長いDNAまで均一に増幅させるためには、チューブナンバー17ないし20又は22ないし27の条件で反応させるのが適していることが分かる。これより、用いる酵素はStoffel又はEx Taqを用いるのが適していること、すなわち、DNA増幅酵素又は長鎖DNA増幅酵素が適していることが分かる。特にEx Taqすなわち、長鎖DNA増幅酵素が適していることが分かる。また、サイクル2で反応させるのが適していること、すなわち、伸長反応をプライマーのアニリングを同時に行うことができる68℃で15分間行うのが適していることが分かる。

【0033】2）酵素選択、均一増幅の条件設定のための実験

PCRのための酵素は、前出のStoffel、Ex Taq及びTth XL（登録商標、パーキンエルマー製）の3種類を用いた。PCRに用いた反応液の組成を表2及び表3に示す。表中、チューブナンバーを除いて各数値の単位はμlである。プライマーは配列1のDNAであり、SPは滅菌蒸留水、Bは反応緩衝液である。チューブナンバー29ないし31の反応液は下記のサイクル3で反応させ、チューブナンバー32ないし34の反応液は下記のサイクル4で反応させた。

【表2】

酵素種	Stoffel	Ex Taq
模板DNA(1.6ng/μl)	2	2
dNTP(2.5mM)	1.6	1.6
10×B	2	2
プライマー(5pmol/μl)	2	2
酵素	0.2	0.1
SP	8.2	12.3
MgCl ₂ (25mM)	4	0
γ-7' Na(サイクル3)	29	30
γ-7' Na(サイクル4)	32	33

【表3】

酵素種	Tth				
プライマー(5pmol/μl)	2	2	2	2	2
Mg(OAc) ₂ (25mM)	0.56	0.72	0.88	1.04	1.20
dNTP(2.5mM)	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
3.3×B	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4
SP	1.44	1.28	1.12	0.96	0.80
3.3×B	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6
酵素	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
模板DNA(1.6ng/μl)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
SP	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
γ-7' Na(hot)	35	36	37	38	39
γ-7' Na(normal)	40	41	42	43	44

【0034】サイクル3：94℃で1分間反応させた後、（94℃で20秒間→68℃で15分間）のサイクルを30回繰り返して反応させた。
 サイクル4：94℃で1分間反応させた後、（94℃で15秒間→68℃で10分間）のサイクルを16回繰り返して反応させ、続いて（94℃で15秒間→68℃で11分間）のサイクルを4回繰り返して反応させ、続いて（94℃で15秒間→68℃で12分間）のサイクルを4回繰り返して反応させ、続いて（94℃で15秒間→68℃で13分間）のサイクルを4回繰り返して反応させた。

【0035】なお、チューブナンバー35ないし39の反応液についてはhot startとし、チューブナ

ンバー40ないし44の反応液については通常の方法で反応を開始した。hot startとは、まず、表3の反応液中、low mixのみを反応液として分注し、これに滅菌ワックス（使用したものはAmpliwax（登録商標、パーキンエルマー社製））を加え、75℃で5分間、続いて4℃で10分間置いた後、表3中のup mix-1及びup mix-2を反応液として加えて、PCRを行うものである。実際のPCRでは装置のブロックを予め95℃にした後チューブをセットし反応を開始させた。

【0036】反応後、各反応液から6μlの反応液をとり、0.7%アガロースゲル電気泳動で分析した。これを、蛍光色素エチジウムブロマイドで染色した。結果を

図3に示す。図中に示した各レーンの数字は、各反応液のチューブナンバーに対応している。また、各レーンにおいて、各レーン中の各バンドの現れ方が、マーカーのバンドの現れ方と似ているほど、DNA増幅が均一に行われており好ましいことを表す。

【0037】この図から、以下のことが分かる。

- ①チューブナンバー29ないし31に比しチューブナンバー32ないし3の方がDNAが均一に増幅されていること。すなわち、サイクル4が好ましく、伸長反応時間が順次長くなる方がよいこと。
- ②チューブナンバー29及び32、チューブナンバー30、31、33及び34、チューブナンバー35ないし44の各群間では、順にDNA増幅がうまく行われていると認められること。すなわち、使用する酵素は、Stoffel<ExTaq<Tth XLの順で各DNA増幅が均一に行われること。すなわち、長鎖DNA増幅酵素がより適していること。
- ③チューブナンバー30と31の間又はチューブナンバー33と34の間では、DNAの増幅に差が見られないこと。すなわち、ExTaqに関しては、酵素量による差は見られないこと。
- ④チューブナンバー35及び36とチューブナンバー3

7ないし39の両群間又はチューブナンバー40及び41とチューブナンバー42ないし44の両群間では、いずれも後者がDNA増幅がうまく行われていること。すなわち、Mg²⁺濃度によりDNA増幅に変化が見られ、1.1ないし1.5mMの濃度で各DNAの増幅が均一に行われること。したがって、DNAの均一な増幅のためには、Tth XLを用いて、伸長反応時間を順次長くし、Mg²⁺を適量加える条件が適していることが分かる。

【0038】3) 反応最適化のための実験

PCRのための酵素は、Tth XLを用いた。PCRに用いた反応液の組成を表4に示す。表中、チューブナンバーを除いて各数値の単位は μ lである。プライマーは配列1のDNAであり、SPは滅菌蒸留水、Bは反応緩衝液である。チューブナンバー45ないし48の反応液は下記のサイクル5で反応させ、チューブナンバー49ないし54の反応液は下記のサイクル6で反応させた。全てのサンプルについてhot startとした。実際のPCRでは装置のブロックを予め95℃にした後チューブをセットし反応を開始させた。

【表4】

酵素種	Tth					
プライマー(5pmol/ μ l)	1	1	2	2	1.6	1.6
Mg(OAc) ₂ (25mM)	0.88	1.2	0.88	1.2	0.73	0.73
dNTP(2.5mM)	1.6	1.6	1.6	1.6	1.32	1.32
3.3×B	2.4	2.4	2.4	2.4	2.0	2.0
SP	2.12	1.8	1.12	0.8	0.95	0.95
3.3×B	3.6	3.6	3.6	3.6	3.0	3.0
酵素	0.4	0.4	0.4	0.4	0.33	0.33
型DNA(1.6ng/ μ l)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	1.0
SP	6.0	6.0	6.0	6.0	4.57	5.57
チューブNa(サイクル5)	45	46	47	48	—	—
チューブNa(サイクル6)	49	50	51	52	53	54

low mix

up mix1

up mix2

【0039】サイクル5：94℃で1分間反応させた後、(94℃で15秒間→68℃で10分間)のサイクルを16回繰り返して反応させ、続いて(94℃で15秒間→68℃で11分間)のサイクルを4回繰り返して反応させ、続いて(94℃で15秒間→68℃で12分間)のサイクルを4回繰り返して反応させ、続いて(94℃で15秒間→68℃で13分間)のサイクルを4回繰り返して反応させた。

サイクル6：94℃で1分間反応させた後、(94℃で15秒間→68℃で10分間)のサイクルを16回繰り返して反応させ、続いて25℃で20分間置き、続いて94℃で1分間反応させ、続いて(94℃で15秒間→68℃で11分間)のサイクルを4回繰り返して反応させ、続いて(94℃で15秒間→68℃で12分間)のサイクルを4回繰り返して反応させ、続いて(94℃で15秒間→68℃で13分間)のサイクルを4回繰り返して反

応させた。

【0040】なお、チューブナンバー53及び54の反応液については(94℃で15秒間→68℃で10分間)のサイクルを16回繰り返した後、Ampliwaxが固まった後であり且つ25℃で放置中に下記の組成の液を3.5 μ l加えて、続けて以降の反応をさせた。加えた液の各成分は、最初に加えたものと同じである。

酵素液	0.07 μ l
3.3×B	1.0 μ l
Mg(OAc) ₂	0.15 μ l
dNTP	0.28 μ l
プライマー	0.4 μ l
SP	1.6 μ l
合計	3 μ l

【0041】反応後、各反応液から1 μ lずつ及び5 μ

1 ずつ反応液を取り、それぞれ0.7%アガロースゲル電気泳動で分析した。これを、蛍光色素エチジウムブロマイドで染色した。反応液を1μlずつ取った場合の結果を図1に、また、反応液を5μlずつ取った場合の結果を図4に示す。図中に示した各レーンの数字は、各反応液のチューブナンバーに対応している。また、各レーンにおいて、各レーン中の各バンドの現れ方が、マーカートのバンドの現れ方と似ているほど、DNA増幅がうまく行われていることを表す。

【0042】これらの図から反応最適化のためには、チューブナンバー45又は46の条件が適していること、特にチューブナンバー46の条件が適していることが分かる。これより、以下のことが分かる。

①チューブナンバー45及び46に比し、チューブナンバー47及び48は短いDNAがよく増幅されている。すなわち、プライマー濃度が高いと、短いDNAが増幅され易いこと。

②Mg²⁺濃度は、1.1mMよりも1.5mMの方が、各DNAを均一に増幅できること。すなわち、Mg²⁺濃度によって各DNAの増幅量に差を生じ、1.5mMの方が好ましいこと。

③チューブナンバー45ないし48とチューブナンバー49ないし52の両群間での差はみられないこと。すなわち、途中で反応を20分間止めても、各DNAの増幅量に明らかな差は生じないこと。

④チューブナンバー51及び52とチューブナンバー53及び54の両群間での差がみられないこと。すなわち、途中で酵素を加えても、各DNAの増幅量に明らかな差は生じないこと。

【0043】すなわち、下記に示すチューブナンバー46の条件でPCRを行えば、一度に多種多様なDNAを同時に短い物から長いものまでを均一に増幅することが可能である。

①アダプター二本鎖DNAとして、配列1の一本鎖DNAと、配列2の5'末端をリン酸化した一本鎖DNAと

合成DNA (配列1) (193 pmol/μl)	3 μl
γ-メガラベル ³² P ATP (アマシャム製)	5 μl
10×kination buffer (キット添付品)	1 μl
T4 polynucleotide kinase (キット添付品)	1 μl

上記組成の反応液を37℃で30分間反応させた後、70℃で10分間置き酵素反応を停止させ、滅菌蒸留水で5 pmol/μlにプライマー液を調製した。

【0045】2. PCR

1) このプライマー液を用いて、上述のサイクル1~4の条件でPCRを行った。PCR後の各反応溶液を滅菌水で10倍希釈した後、各1μlを40V2時間0.7%アガロースゲル電気泳動(TAEバッファー使用)にかけ、その後10%TCA(トリクロロ酢酸)、10mMピロリン酸ナトリウム溶液に20分間浸し、その後バイオラッド社のゲルドライヤーモデル583を用いて

をハイブリダイズさせたものを用いて増幅されるDNAと連結する。

②プライマー一本鎖DNAとして、配列1の一本鎖DNAを用いる。

③Tth XLをDNA増幅酵素として用いる。

④PCRの反応を、hot startとし、94℃で1分間反応させた後、(94℃で15秒間→68℃で10分間)のサイクルを16回繰り返して反応させ、続いて(94℃で15秒間→68℃で11分間)のサイクルを4回繰り返して反応させ、続いて(94℃で15秒間→68℃で12分間)のサイクルを4回繰り返して反応させ、続いて(94℃で15秒間→68℃で13分間)のサイクルを4回繰り返して反応させることにより行う。

⑤以下の組成の反応液を用いる。

low mix (最初に加える反応液)	
プライマー (5 pmol/μl)	1. 0 μl
Mg (OAc) ₂ (25 mM)	1. 2 μl
dNTP (2. 5 mM)	1. 6 μl
3. 3×反応緩衝液	2. 4 μl
滅菌蒸留水	1. 8 μl
滅菌ワックス	
up mix 1 (滅菌ワックスが固まってから加える反応液)	
3. 3×反応緩衝液	3. 6 μl
酵素 (Tth XL)	0. 4 μl
up mix 2 (滅菌ワックスが固まってから加える反応液)	
鋳型DNA (1. 6 ng/μl)	2. 0 μl
滅菌蒸留水	6. 0 μl

【0044】<実施例3>プライマーの取り込みの確認

1. 末端ラベル化プライマーの作製

PCRに用いるプライマーは、メガラベル(登録商標、宝酒造製)を用いその説明書に基本的に従い、合成DNA(配列1)を末端放射能ラベル化したものを用いた。末端放射能ラベル化は以下のように行った。

乾燥させた。

2) この乾燥させたアガロースゲルをオートラジオグラフィした。結果を図5に示す。図中各レーンの番号は、PCRのサイクルの番号に対応している。結果より、サイクル2の反応で約8 kbの部分までほぼ均一にプライマーが取り込まれていることが判明した。このことは従来では難しいとされていた複数の長さの異なるDNA群の同時増幅において、DNAの長さに関わらず、ほぼ均一に増幅が可能であることを示している。

【0046】<実施例4>cDNAの増幅

1. cDNAの合成

1) RNAの調製

全RNAは、『Methods in enzymology』Vol. 154 (academic Press Inc.、1987年) pp3~28に記載の方法を基として調製した。

(1) 実際には、ラットより摘出した肝臓を3gを液体窒素中で粉碎し、100mlの5.5M GTC溶液(Guanidiniethanol 5.5mM、N-ラウロニルサルコシン0.5%、25mMクエン酸ナトリウム、pH7.0)に加え、ポッター型ホモジナイザーでホモジネートした。

(2) 溶液を、3000rpm、10分間遠心分離した後、上清液をSW28スイングローター用遠心管(ベックマン製)に加えておいた比重1.6g/mlのセシウムトリフルオロ酢酸溶液(セシウムトリフルオロ酢酸(ファルマシア製)50%、100mMエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA)(pH7.0))12mlに重層し、SW28スイングローターを用いて25000rpm、24時間、15℃で分離を行った。

【0047】(3) 沈殿物を、600μlの4M GTC溶液に溶かし、15000rpmで遠心分離し、溶液部分を回収した。1M酢酸を15μl、エタノール450μlを加え、15000rpm、10分間遠心分離し、沈殿を回収した。

(4) この沈殿を、適当量(約3ml)のTE溶液(1mM Tris-Cl(pH7.5)、1mM EDTA)に溶かし(溶けるまでTE溶液を加えた)、15000rpmで遠心分離し、溶液部分を回収した。

(5) 溶液と同量のフェノール/クロロホルムを混合し、15000rpm、10分間遠心分離し、溶液部分を回収した。

(6) 溶液に1/10容量の3M酢酸ナトリウム(pH5.2)を加え、2.5倍量のエタノールを加え、-20℃で20分間放置後、15000rpmで遠心分離し、沈殿を70%エタノールで洗浄後、乾燥させ、適当量のTE溶液に溶かし、-80℃で保存した。肝臓から7mgの全RNAが得られた。

(7) polyA RNAは、oligotex dT30 super(登録商標、日本ロッシュ製)を用いて、取扱説明書の通りに行った。用いた全RNAの量は一回当たり1mgで、oligotex dT30

superを750μlを用いてpolyA RNAの精製を行った。1mgの全RNAから約20μgのpolyA RNAが得られた。

【0048】2) cDNAの合成

cDNAの合成は、ファルマシア社のcDNA synthesis kitを用いて、その取り扱い説明書に従い行った。

(1) 1) で得られたpolyA RNA 2μgを用いて、First strand cDNA及びSecond strand cDNAを合成した。酵素反応は、キットのklenow fragment処理までを行った後、取り扱い説明に記載のスパンカラム精製までを行った。

(2) 得られたcDNA溶液に2. で作製したPCR用アダプターを18.8μl(6.7pmol/μl)に加え、キットに添付されている、ATP solution 1μl及びT4 DNA ligase 3μlを加え、12℃で16時間ライゲーション反応を行った。

(3) 65℃で10分間置き酵素反応を失活させた後、溶液に100μlのPhenol/CHCl₃溶液を加え、攪拌した後、水溶液相を回収した。

(4) この溶液を、STE溶液(150mM NaClを含むTE溶液)で平衡化したスパンカラム(キット取扱説明書に記載の方法にて平衡化)を用いて、キット取扱説明書に記載の方法で精製を行った。溶出された溶液をSTE溶液にて150μlに調製した。この溶液を以下のPCRに使用した。

【0049】2. cDNAのPCR

PCRに用いた反応液の組成を表5に示す。表中、チューブナンバーを除いて各数値の単位はμlである。プライマーは配列1のDNAであり、SPは滅菌蒸留水、Bは反応緩衝液である。チューブナンバー55及び56のサンプルは、鋳型DNAとして実施例3の1. で作製したDNAを用い、チューブナンバー57ないし63のサンプルについては、鋳型DNAとして実施例4の1. で作製したcDNA(アダプターDNAを結合させたもの)を用いた。全てのサンプルについて反応液は下記のサイクル7で反応させ、また、hot startとした。実際のPCRでは装置のブロックを予め95℃にした後チューブをセットし反応を開始させた。

【表5】

酵素種	Tth									
プライマー (5pmol/ μ l)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Mg(OAc) ₂ (25mM)	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	0.56	0.88	1.44	1.2	
dNTP (25mM)	1.6	1.6	1.2	1.6	2.0	1.6	1.6	1.6	1.6	
3.3×B	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	
SP	1.8	1.8	2.2	1.8	1.4	2.44	2.12	1.56	1.8	
3.3×B	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	
酵素	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	
標型DNA (1.6ng/ μ l)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
SP	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	
チューブNo	55	56	57	58	59	60	61	62	63	

low mix

up mix1

up mix2

【0050】サイクル7: 94℃で1分間反応させた後、(94℃で15秒間→68℃で10分間)のサイクルを16回繰り返して反応させ、続いて(94℃で15秒間→68℃で10分間+各サイクルごとに15秒増加)のサイクルを12回繰り返して反応させ、72℃で10分間反応させ、4℃で放置した。反応終了後、各チューブの反応液1 μ lについて0.7%アガロース電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色により検出を行った。

【0051】結果を図6に示す。図中、各レーンの番号はサンプルのチューブナンバーに対応している。図から分かるように、実施例1で作製したDNAを増幅させたものでは20kbまでの増幅が認められ、これまでの実験結果で増幅が確認されたDNAよりも長いDNAを増幅することが達成された。また、cDNAの増幅においては、0.5ないし8kb程度までの連続的な増幅が確認され、生体由来のcDNAライブラリーの増幅が可能であることが確認された。

【0052】

【発明の効果】本発明のアダプターDNAにより、増幅されるDNAの両端それぞれに、正確に一方方向で一つだけ該アダプターDNAを結合させることが可能となる。

配列

AGG AAT TCA GCG GCC GCA GAT ATC

【0054】配列番号: 2

配列の長さ: 25

配列の型: 核酸

配列

GAT ATC TGC GGC CGC TGA ATT C

【図面の簡単な説明】

【図1】PCR後の各反応液を0.7%アガロースゲル電気泳動で分析し、蛍光色素エチジウムブロマイドで染色した結果を表す図である。

【図2】PCR後の各反応液を0.7%アガロースゲル電気泳動で分析し、蛍光色素エチジウムブロマイドで染色した結果を表す図である。

【図3】PCR後の各反応液を0.7%アガロースゲル電気泳動で分析し、蛍光色素エチジウムブロマイドで染

またアダプター同士が幾つもつながることなく、正確にPCRを行うことが可能となる。また、本発明のアダプターDNAにより、市販のcDNAライブラリー用ベクターの使用及び、どのようなベクターへもDNAを容易に且つ効率的に導入することが可能となる。従来、多種多様なDNAを同時に増幅する場合には、長くても1kb程度までのDNAしか均一に増幅できなかったが、本発明により、より長いDNAであっても均一に増幅できるという従来にない効果が得られる。一例として、0.5ないし8kbの長さのDNAを同時に均一に増幅できる。また、本発明により、1kb以上の多種多様なDNA含む生体由来のcDNAライブラリーを同時に均一に増幅することが可能となる。

【0053】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 24

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類:

24

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類:

22

色した結果を表す図である。

【図4】PCR後の各反応液を0.7%アガロースゲル電気泳動で分析し、蛍光色素エチジウムブロマイドで染色した結果を表す図である。

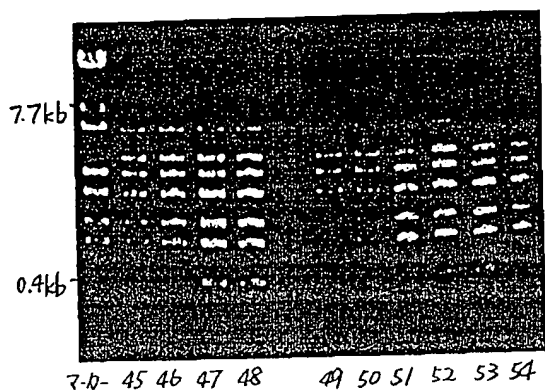
【図5】末端をラベル化したプライマーを用いてPCR後の各反応液を0.7%アガロースゲル電気泳動で分析し、オートラジオグラフィーした結果を表す図である。

【図6】ラット肝臓由来のcDNAについてPCRを行った後、各反応液を0.7%アガロースゲル電気泳動で

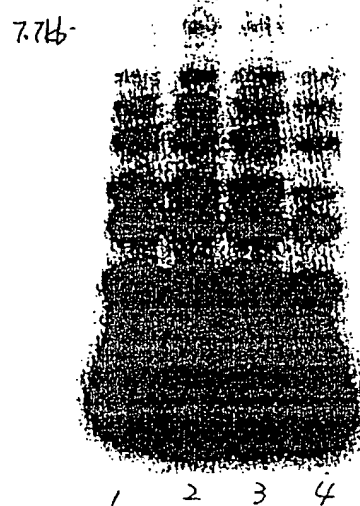
分析し、蛍光色素エチジウムブロマイドで染色した結果を表す図である。

【図7】実施例2で作製したアダプターDNAの制限酵素サイトを示す図である。

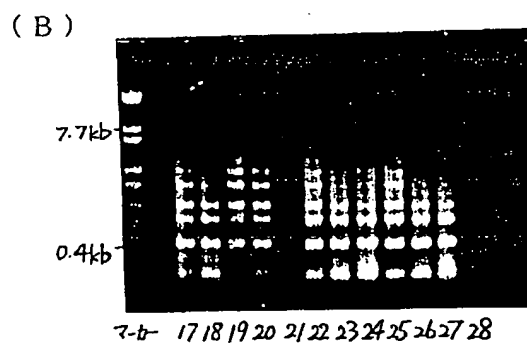
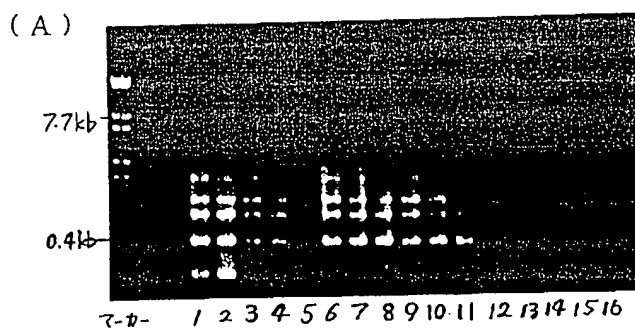
【図1】



【図5】



【図2】

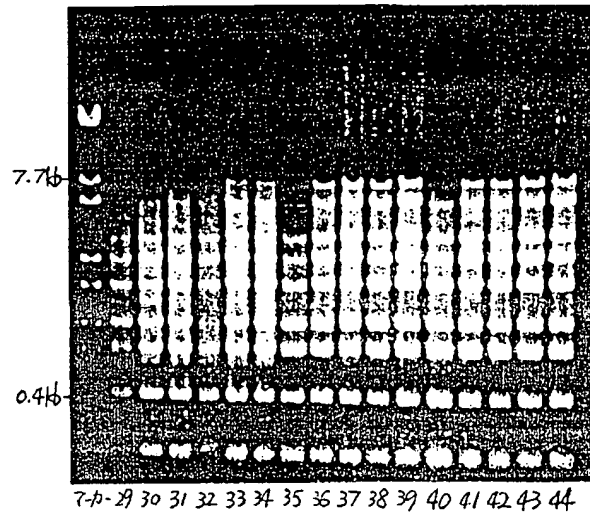


【図7】

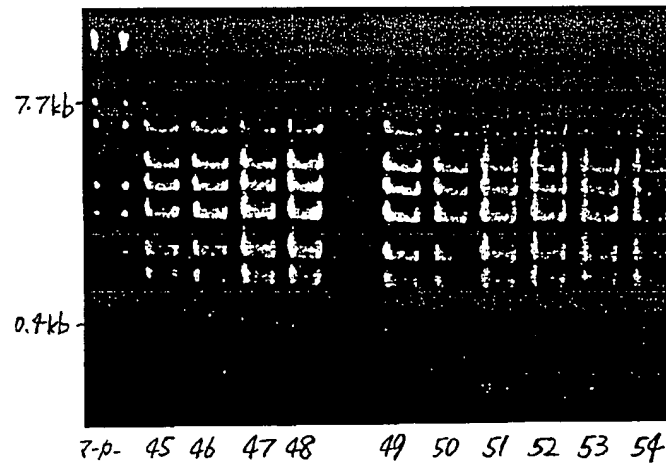
```

5'  AGG AAT TCA GCG GCC GCA GAT ATC  3'
3'   C TTA AGT CGC CGG CGT CTA TAG  5'
    -----
    EcoRIサイト  NotIサイト  EcoRVサイト
  
```

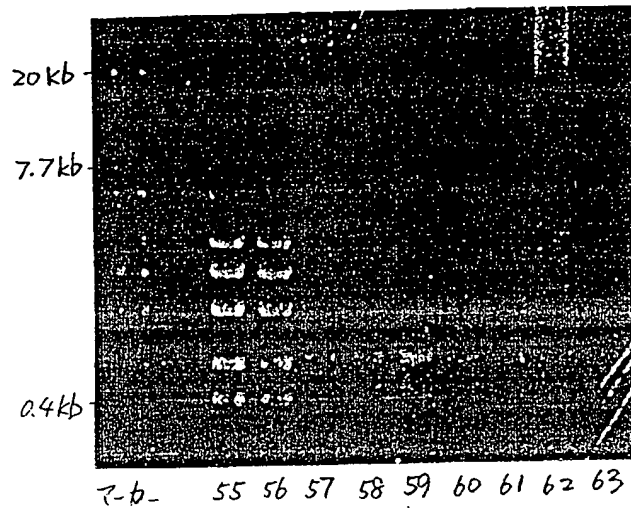
【図3】



【図4】



【図6】



【手続補正書】

【提出日】平成8年6月13日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正内容】

【図面の簡単な説明】

【図1】PCR後の各反応液を0.7%アガロースゲル電気泳動で分析し、蛍光色素エチジウムブロマイドで染色した結果を表す図面に代わる写真である。

【図2】PCR後の各反応液を0.7%アガロースゲル電気泳動で分析し、蛍光色素エチジウムブロマイドで染色した結果を表す図面に代わる写真である。

【図3】PCR後の各反応液を0.7%アガロースゲル電気泳動で分析し、蛍光色素エチジウムブロマイドで染

色した結果を表す図面に代わる写真である。

【図4】PCR後の各反応液を0.7%アガロースゲル電気泳動で分析し、蛍光色素エチジウムブロマイドで染色した結果を表す図面に代わる写真である。

【図5】末端をラベル化したプライマーを用いてPCR後の各反応液を0.7%アガロースゲル電気泳動で分析し、オートラジオグラフィーした結果を表す図面に代わる写真である。

【図6】ラット肝臓由来のcDNAについてPCRを行った後、各反応液を0.7%アガロースゲル電気泳動で分析し、蛍光色素エチジウムブロマイドで染色した結果を表す図面に代わる写真である。

【図7】実施例2で作製したアダプターDNAの制限酵素サイトを示す図である。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.